CARACTÉRISATION DES MYCORHIZES DE DIFFÉRENTS *TUBER* PAR L'ÉTUDE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE

Chantal DUPRE*, Gérard CHEVALIER*, Mario PALENZONA** et Ettore BIOCCA***

* Station d'Agronomie et de Mycologie, Unité de Mycologie, I.N.R.A., 12 avenue du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.
** Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (I.P.L.A.), corso Casale 476, 10132 Turin, Italie.
*** Université "La Sapienza", Istituto di Parassitologia, Rome, Italie.

RÉSUMÉ - L'étude du polymorphisme enzymatique dans les mycorhizes de différents *Tuber* montre que l'activité enzymatique de la glutamate-déshydrogénase à NADP constitue un critère sûr de différenciation. Ce critère biochimique est intéressant pour identifier le symbiote fongique, lorsque des espèces différentes de *Tuber* présentent des mycorhizes morphologiquement identiques (*T. aestivum* - *T. uncinatum*) ou très voisines (*T. melanosporum* - *T. brumale*).

ABSTRACT - A study of the enzymatic polymorphism in the ectomycorrhizas of several *Tuber* species has shown that the enzymatic activity of the NADP - dependent GDH is a reliable criterion of discrimination. This biochemical criterion is interesting for identifying the fungal symbiot, when different *Tuber* species exhibit mycorrhizas with a quite similar morphology (e.g. *T. aestivum* - *T. uncinatum*) or nearly so (for example *T. melanosporum* - *T. brumale*).

MOTS CLÉS : *Tuber*, ectomycorhizes, analyse électrophorétique, variabilité enzymatique.

INTRODUCTION

L'analyse électrophorétique de certaines protéines à fonction enzymatique peut s'avérer un outil intéressant pour différencier les espèces fongiques, qu'il s'agisse de *Tuber* (Palenzona et al., 1988) ou d'autres genres (Yoon et al., 1990; Perreau et al., 1992).

Dans un travail précédent, Dupré & Chevalier (1991) ont démontré que la composition protéinique des mycéliums de *Tuber* en culture pure ou en association avec le noisetier (*Corylus avellana* L.) s'avérait un critère hautement spécifique en taxonomie; toutefois, la technique de l'électrophorèse des protéines totales n'a pas permis de mettre en évidence des groupes de polypeptides fongiques communs au mycélium en culture et au mycélium associé à la racine.

Le polymorphisme enzymatique s'est également révélé un critère d'une haute spécificité. Palenzona et al. (1988), puis Pacioni & Pomponi (1989) ont montré qu'il était possible d'utiliser les systèmes "gène-enzyme" pour différencier les espèces de



Tuber à partir des ascocarpes. Dupré et al. (1992) ont appliqué la même méthode à l'étude des mycéliums en culture et prouvé qu'avec les systèmes enzymatiques utilisés (MDH, IDH, 6 PGDH, SOD, GOT, PGM, MPI et PGI), les patterns obtenus étaient identiques à ceux des ascocarpes; par contre, il ne leur a pas été possible de mettre en évidence les isoenzymes du champignon à l'état symbiotique.

Des essais ultérieurs avec les systèmes GDH à NAD, ACP et estérases ont donné des résultats, soit négatifs (GDH à NAD), soit difficiles à interpréter, par suite du manque de netteté des bandes (ACP et estérases).

Finalement, grâce à l'utilisation du système GDH à NADP, qui avait donné des résultats intéressants sur épicéa mycorhizé par *Hebeloma* sp. (Dell et al., 1989), nous avons pu "marquer" notre champignon en association avec la racine.

L'objectif de ce travail est de décrire la technique qui a permis de caractériser les mycorhizes de *Tuber* avec ce système et de montrer son intérêt en systématique et comme outil de contrôle de la mycorhization.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1/ Matériel végétal

L'inoculation et l'élevage de plantules de *Corylus avellana* L., ainsi que les prélévements de mycorhizes ont été effectués selon les techniques décrites par Dupré & Chevalier (1991).

2/ Matériel fongique

Six espèces de *Tuber* ont été étudiées, représentées par vingt deux individus: *T. aestivum* Vitt. (Truffe d'été), une truffe, provenant de Provence (région d'Aix en Provence); *T. albidum* Pico ("Blanquette"), quatre truffes, provenant de Toscane (région de Grosseto, Italie); *T. brumale* Vitt., trois truffes, provenant du Périgord (région de Bergerac); *T. melanosporum* Vitt. (T. du Périgord), sept truffes provenant du Périgord (région de Bergerac, cinq truffes), des Marches (région de Fabriano, Italie, une truffe) et de Provence (région des Baux de Provence, une truffe); *T. rufum* Pico ("nez de chien"), une truffe provenant d'Auvergne (région de Clermont-Ferrand); *T. uncinatum* Ch. (Truffe de Bourgogne), six truffes provenant de Lorraine (région de Commercy, une truffe) et de Bourgogne (région de Tonnerre, cinq truffes).

Les prélèvements de gléba ont été faits sur des ascocarpes frais ou congelés conservés à -80°C, après congélation dans l'azote liquide.

Les cultures mycéliennes ont été réalisées selon la méthode décrite par Dupré & Chevalier (1991).

3/ Extraction des protéines

Dans le cas des cultures mycéliennes et des ascocarpes, l'extraction des protéines est effectuée à partir de 350 à 400 mg de matériel fongique (Dupré et al., 1992); dans le cas des mycorhizes, à partir de 150 à 200 apex mycorhizés. Les mycorhizes sont conservées, après nettoyage, 24 heures dans 1 ml d'eau désionisée stérile à 4°C. Durant ce temps, nous avons remarqué un léger développement dans l'eau du mycélium frangeant des mycorhizes. Ceci nous a permis d'augmenter sensiblement la quantité de mycélium par rapport au matériel végétal.

Les mycorhizes sont récupérées sur papier filtre Whatman puis déposées dans un mortier. Elles sont broyées dans de l'azote liquide en présence de PVP (polyclar, 10% et PVP 40, 2%) et de sable de Biot. On ajoute 500 µl de solution d'extraction (Chalot et al., 1989): Tris-HCl, 50 mM (pH 8); glycérol, 10%; béta mercaptoéthanol, 14 mM (1µl/ml); glutamate, 10 mM; $MgSO_4$, 10 mM; EDTA, 2 mM; PMSF, 1mM. Le dosage de la quantité de protéines est réalisé à l'aide du réactif préconisé par Biorad d'après la technique de Bradford (1976). Après une centrifugation à 10 000 g pendant 2 minutes, on récupère le surnageant contenant les protéines. Les extraits sont conservés dans des tubes cryogéniques à l'ultracongélateur à -80°C ou dans l'azote liquide.

4/ Electrophorèse

L'électrophorèse monodimensionelle en système discontinu, sur gels uniformes de polyacrylamide, en conditions non dénaturantes, est réalisée verticalement en minicuve "Mini Protean II" Biorad. Les dimensions des gels sont de: 8 x 7,3 x 0,075 cm.

Le gel de séparation est coulé sur une hauteur de 5,5 cm.

- Composition du gel à 6% de polyacrylamide (Botton et Chalot, 1991): Solution A (acrylamide, 30 g; bisacrylamide, 0,8 g; eau permutée, qsp 100 ml), 2,0 ml; Tris 1M (pH 8,8), 3,5 ml; ammonium persulfate 1,5%, 0,5 ml; TEMED, 10 µl; eau permutée, 3,8 ml.

- Composition du gel de concentration à 1,5% de polyacrylamide: Solution B (acrylamide, 10,0 g; bisacrylamide, 2,5 g; eau permutée, qsp 100 ml), 1,2 ml; Tris 1M (pH 6,8), 0,5 ml; ammonium persulfate, 0,2 ml; eau permutée, 2,1 ml.

Après polymérisation du gel de séparation, le gel de concentration est coulé et un peigne de 10 puits destinés à contenir les dépôts protéiques y est inséré. Avec une microseringue, on dépose 30 µl d'extrait contenant de 9 à 12 µg de protéines dans chacun des 10 puits. Le tampon de migration électrophorétique en conditions non dénaturantes a la composition suivante: Tris, 2 g; glycine, 9,6 g; eau permutée, qsp 1 litre.

L'électrophorèse se déroule à voltage constant (180 volts) pendant 50 minutes à 4°C.

5/ Révélation enzymatique

La solution de révélation de la glutamate déshydrogénase à NADP est la suivante:

Tampon Tris-HCl (pH 8), 40 ml; L glutamate, 224 mg; NBT, 32 mg; PMS, 56 mg; NADP, 15 mg (Blumenthal & Smith, 1973).

Le gel immergé dans la solution de révélation est placé dans une étuve à 37°C pendant 45 minutes à 1 heure. Des taches bleues apparaissent; elles correspondent à la formation d'un précipité de formazan. Une autre série de taches claires apparaissent également; il s'agit d'une réaction SOD (superoxyde-dismutase) fréquente dans les colorations utilisant le "système tétrazolium".

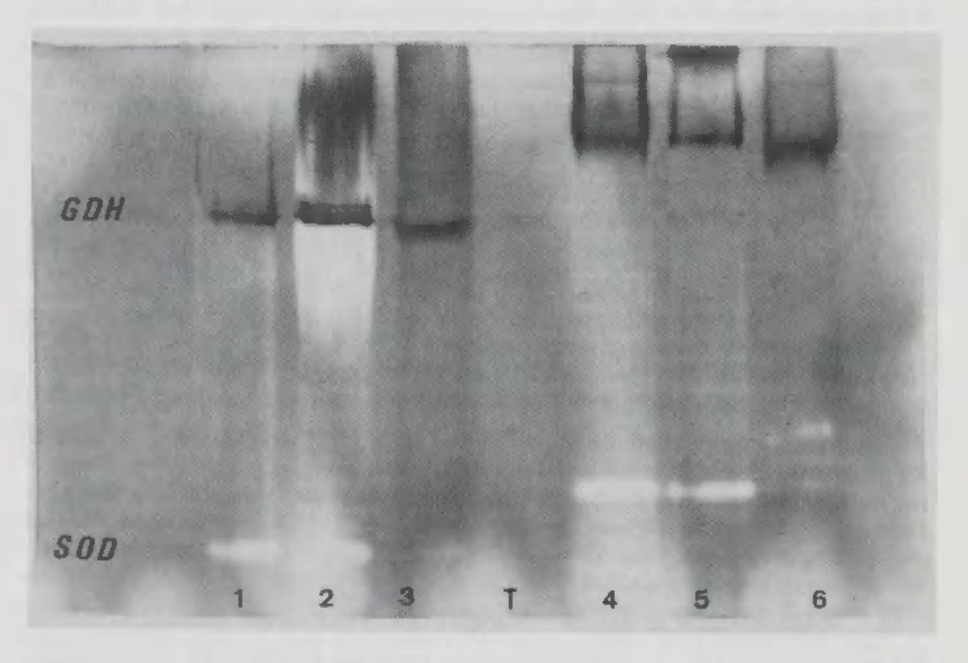
Dès l'apparition des taches bleues, on rince à l'eau permutée et on fixe la coloration. Composition du fixateur: acide acétique, 100 ml; glycérol, 100 ml; eau permutée, qsp 1 litre.

RÉSULTATS

1/ Polymorphisme enzymatique dans les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes de *T. melanosporum* et *T. uncinatum*.

Les profils présentés sur la figure 1 (provenant chacun d'individus différents) montrent qu'au sein d'une même espèce, la mobilité électrophorétique de la GDH à NADP est identique; il en est de même pour celle de la SOD; par contre, entre espèces, le polymorphisme est suffisant pour permettre une différenciation nette.

Nous n'avons pas observé de bande dans la piste (T) correspondant aux racines non mycorhizées.



T. melanosporum T. uncinatum

Fig. 1 - Zymogrammes de la GDH à NADP et de la SOD dans les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* (*T. melanosporum*: 1, ascocarpe, Provence; 2, mycélium en culture, Marches; 3, mycorhizes sur *C. avellana*, Périgord - *T. uncinatum*: 4, ascocarpe, Lorraine; 5, mycélium, Bourgogne; 6, mycorhizes, Bourgogne; T, racine témoin non mycorhizée).

Fig. 1 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH and SOD in ascocarps, mycelial cultures and mycorrhizas of *T. melanosporum* and *T. uncinatum* (*T. melanosporum*: 1, ascocarp, Provence; 2, mycelial culture, Marches; 3, *C. avellana* mycorrhizas, Perigord - *T. uncinatum*: 4, ascocarp, Lorraine; 5, mycelium, Burgundy; 6, mycorrhizas, Burgundy; T, non mycorrhized root).

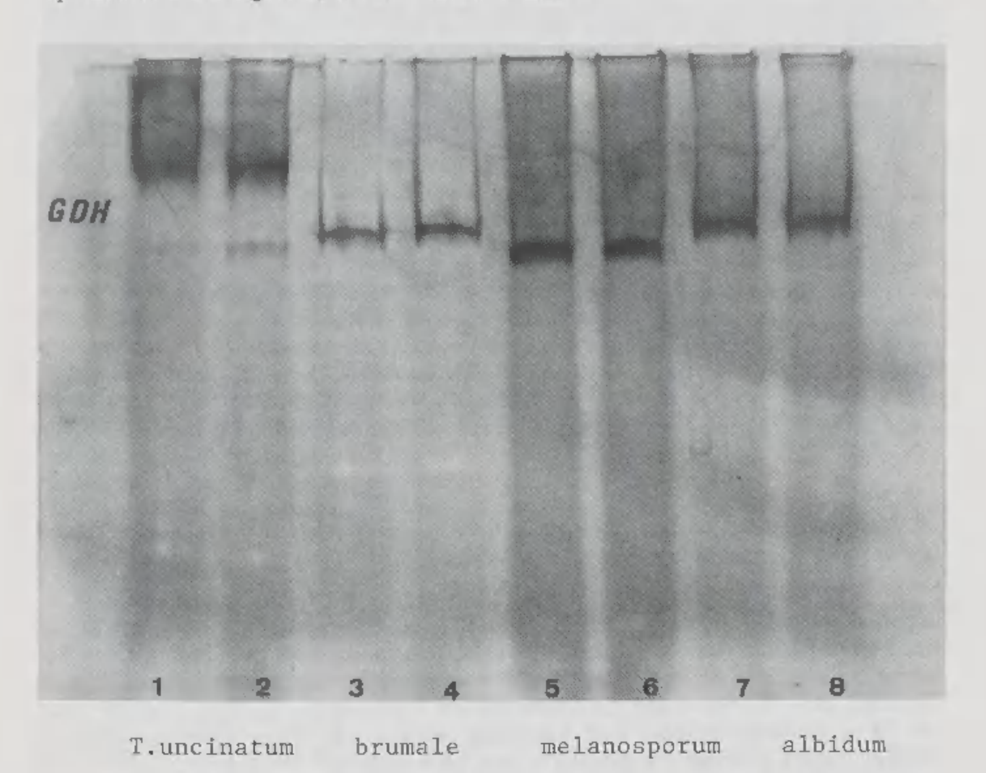
2/ Polymorphisme enzymatique dans les mycorhizes de différentes espèces de *Tuber* avec *Corylus avellana*.

Les profils des figures 2 et 3 (provenant, comme ceux de la figure 1, d'individus différents) confirment la possibilité de différencier les espèces entre elles, alors que, dans une même espèce, les distances de migration des taches montrent une remarquable homogénéité. Nous avons calculé, pour la GDH à NADP, les moyennes des Rf pour corriger les effets de différences dues à la lecture sur plusieurs gels. Les moyennes ont été effectuées de la façon suivante:

$$Rf = \frac{3(Rfc) + 3(Rfa) + 3(Rfm)}{9}$$

avec: Rfc = valeur correspondant à la bande révélant la GDH à NADP pour les cultures mycéliennes; Rfa = idem pour les ascocarpes; Rfm = idem pour les mycorhizes; 3 et 9 = nombre de répétitions.

Les Rf des bandes révélant la GDH à NADP, pour les espèces de *Tuber* représentées sur la figure 2, ont les valeurs suivantes:



T.uncinatum brumale melanosporum albidum

Fig. 2 - Zymogrammes de la GDH à NADP dans les mycorhizes de quatre espèces de *Tuber* avec *C. avellana* (1 et 2: *T. uncinatum*, Bourgogne; 3 et 4: *T. brumale*, Périgord; 5 et 6: *T. melanosporum*, Périgord; 7 et 8: *T. albidum*, Toscane).

Fig. 2 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH in mycorrhizas of four *Tuber* species with *C. avellana* (1 and 2: *T. uncinatum*, Burgundy; 3 and 4: *T. brumale*, Perigord; 5 and 6: *T. melanosporum*, Perigord; 7 and 8: *T. albidum*, Tuscany).

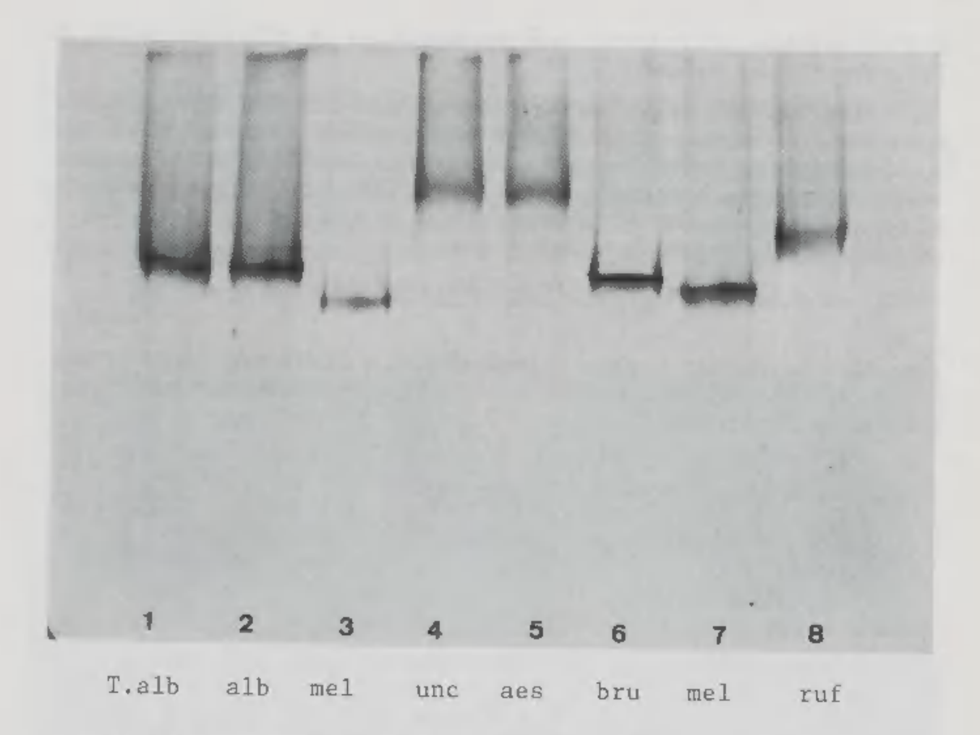


Fig. 3 - Zymogrammes de la GDH à NADP dans les mycorhizes de six espèces de *Tuber* avec *C. avellana* (1 et 2: *T. albidum*, Toscane; 3: *T. melanosporum*, Périgord; 4: *T. uncinatum*, Bourgogne; 5: *T. aestivum*, Provence; 6: *T. brumale*, Périgord; 7: *T. melanosporum*, Périgord; 8: *T. rufum*, Auvergne).

Fig. 3 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH in mycorrhizas of six *Tuber* species with *C. avellana* (1 and 2: *T. albidum*, Tuscany; 3: *T. melanosporum*, Perigord; 4: *T. uncinatum*, Burgundy; 5: *T. aestivum*, Provence; 6: *T. brumale*, Perigord; 7: *T. melanosporum*, Perigord; 8: *T. rufum*, Auvergne).

T. uncinatum, 0,271; *T. brumale*, 0,410; *T. melanosporum*, 0,471; *T. albidum*, 0,433.

Certaines espèces proches dans la systématique, telles *T. uncinatum* et *T. aestivum* ont une bande majeure semblable (fig. 3). *T. uncinatum* possède une bande fine supplémentaire (visible sur la fig. 2); chez *T. melanosporum* et *T. brumale*, les distances de migration de la GDH à NADP sont voisines, mais celles de la SOD sont beaucoup plus discriminantes. Les distances de migration de la GDH à NADP chez ces deux dernières espèces sont également voisines de celles observées chez *T. albidum*, espèce pourtant éloignée sur le plan taxonomique.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les 12 systèmes enzymatiques étudiés, seule la GDH-NADP a permis de mettre en évidence de manière constante une activité enzymatique à partir des mycorhizes de *Tuber*; la SOD a donné des résultats plus irréguliers.

Le rôle clé de la GDH dans l'assimilation de l'azote ammoniacal dans les mycorhizes d'épicéa a été clairement mis en évidence par Dell et al. (1989). Ces auteurs ont démontré que, dans des extraits bruts de mycorhizes d'*Hebeloma* sp. sur épicéa (*Picea excelsa* L.) de deux ans, 85% de l'activité totale de la GDH sont dus à la GDH à NADP du champignon; au contraire, la GDH fongique est fortement réprimée *in vitro* dans les mycorhizes du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex St Amans) et *Paxillus involutus* (Batsch ex Fr) Fr. La présence de GDH à NADP dans les extraits de mycorhizes d'épicéa suggère que l'ammonium absorbé par les mycorhizes est d'abord assimilé par la GDH à NADP dans les tissus de l'hôte pour produire du glutamate qui pourrait par la suite être catalysé par la glutamine-synthétase (GS) du champignon, avant d'être transporté comme glutamine vers les cellules de la plante.

Chez les *Tuber*, les profils obtenus avec les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes donnent la même réponse, pour une espèce de *Tuber* donnée.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment, mais complètent également ceux publiés en 1992 par Dupré et al.; en effet, jusqu'ici, la caractérisation des mycorhizes ne pouvait être obtenue que par une voie indirecte consistant à réaliser l'électrophorèse des isoenzymes sur les cultures de mycélium isolé à partir des mycorhizes; dans le travail présenté ici, l'analyse est effectuée directement sur les mycorhizes, ce qui simplifie fortement la technique.

La forte affinité entre les profils électrophorétiques de *T. aestivum* et *T. uncinatum* confirme les résultats obtenus en 1992 par Gandeboeuf, dans une étude menée sur la différenciation des deux taxons par l'analyse des isoenzymes des ascocarpes et des cultures mycéliennes.

L'analyse électrophorétique des isoenzymes présentes dans les mycorhizes des *Tuber* fournit donc un outil extrêmement intéressant de contrôle biochimique de la mycorhization des plants, lorsqu'une forte convergence de la morphologie des mycorhizes rend difficile l'identification du symbiote fongique par les méthodes classiques: c'est le cas pour *T. aestivum* - *T. uncinatum* et *T. albidum* - *T. magnatum*. Ces deux derniers *Tuber* font actuellement l'objet d'une recherche spécifique, en collaboration avec le Département de Génétique et Biologie moléculaire de l'Université "La Sapienza" de Rome.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention européenne dans le cadre du Plan d'intégration méditerranéen et du projet "Relance de la trufficulture en Aquitaine".

BIBLIOGRAPHIE

BLUMENTHAL K.M. and SMITH E.L., 1973 - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. I. Isolation, subunits, amino acid composition, sulfhydryl groups, and identification of a lysine residue reactive with pyridoxal phosphate and N-ethyl-maleimide. *J. Biol. Chem.* 248: 6002-6008.

BOTTON [redacted]. and CHALOT M., 1991 - Techniques for the study of nitrogen metabolism in ectomycorrhiza. *In:* J.R. Norris, D.J. Read & A.K. Warna, *Methods in microbiology* 23. New-York, Academic press: 203-252.

BRADFORD M.M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.

CHALOT M., BRUN A. and BOTTON B., 1989 - Occurrence and distribution of the fungal NADP-dependent glutamate dehydrogenase in spruce and beech ectomycorrhizas. *In:* D. Werner & P. Müller, *Fast growing trees and nitrogen fixing trees.* Stuttgart, New York, Gustav Fischer: 324-327.

DELL B., BOTTON B., MARTIN F. and LE TACON F., 1989 - Glutamate dehydrogenases in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.* 111: 683-692.

DUPRE C. et CHEVALIER G., 1991 - Analyse électrophorétique des protéines fongiques de différents *Tuber* en association ou non avec *Corylus avellana*. *Cryptogamie, Mycol.* 12: 243-250.

DUPRE C., CHEVALIER G., PALENZONA M., FERRARA A.M., NASCETTI G., MATTIUCCI S., D'AMELIO S., LA ROSA G. ■ BIOCCA E., 1992 -Differenzazione genetica di ascocarpi, miceli e micorrize di differenti specie di *Tuber*. *In:* Compt. Rend. Congr. Internatl. sur la truffe (l'Aquila, 5-8 mars 1992): 145-159 (sous presse).

GANDEBOEUF D., 1992 - Différenciation de deux taxons de *Tuber* par l'analyse des isoenzymes. Mémoire de stage de maîtrise, Université de Clermont-Fd II, 25 p.

PACIONI G. and POMPONI G., 1989 - Chemotaxonomy of some italian species of *Tuber*. *Micol. Veget. Medit.* 4: 63-72.

PALENZONA M., BIOCCA E., NASCETTI G., FERRARA A.M., MATTIUCCI S., D'AMELIO S. ■ BALBO T., 1988 - Studi preliminari sulla tipizzazione genetica (sistemi gene-enzima) di specie del genere *Tuber*. *In:* Compt. Rend. 2ème Congrès internatl. sur la truffe (Spoleto, 24-27 novembre 1988): 53-58.

PERREAU J., LAMBOURDIERE J. et BOISSELIER M.C., 1992 - *Mycena rosea* et le complexe *Mycena pura*. *Cryptogamie, Mycol.* 13: 247-251.

YOON C.S., GESSNER R.V. and ROMANO M.A., 1990 - Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia* 82: 227-235.